

การชักนำไซมาติกเอ็มบริโอและการเกิดยอดในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และ
ปทุมมาพันธุ์ลัดดาวลัย

**Somatic Embryo Induction and Shoot formation in *Curcuma alismatifolia* and
Curcuma hybrid 'Laddawan'**

ญาดา บุญสอน (Yada Boonsorn)* ดร.อัญชลี จาละ (Dr.Anchalee jala)**

ดร.ธรรธร ทิระฐิติ (Dr.Tharathorn Teerakathiti)***

บทคัดย่อ

เมื่อนำต้นปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวลัยที่เพาะเลี้ยงได้จากช่อดอก มาทำการทดลองชักนำไซมาติกเอ็มบริโอ(somatic embryo) สามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 8 10 12 และ 14 มก./ล. ในที่มีดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวลัยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 14 มก./ล. มีอัตราการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอที่ดีที่สุดเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 14 มก./ล. มาทำการทดลองชักนำยอดพบว่าไซมาติกเอ็มบริโอของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวลัยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส 0.25 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ไซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดคือ 50.00 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ABSTRACT

Curcuma alismatifolia and *Curcuma hybrid* 'Laddawan' are highly valued ornamental. Inflorescences were isolated and culture on different variations of Murashige and Skoog (MS) media to induce somatic embryo and then shoot formation. When the plant were at the uninucleate developmental stage were cultured in the dark on MS medium containing 14 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for 4 weeks, the percentage somatic embryo induction reached 90.00 percent. After somatic embryo was transferred to MS medium supplemented with maltose 0.25 g / liter resulted in somatic embryo development was the best was 50.00 and 46.67 percent respectively.

คำสำคัญ : ปทุมมา ไซมาติกเอ็มบริโอ กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีแอซิดิก

Key Words : *Curcuma* sp., Somatic embryo, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

*นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**รองศาสตราจารย์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

***นักวิจัย ศูนย์พันธุ์พืชกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

บทนำ

ปทุมมาจัดเป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma* มีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศอินโดจีน พม่า และไทย (อรรณพ, 2548) ปทุมมาเป็นพืชพื้นเมืองไทย ที่กำลังได้รับความนิยมในวงการไม้ดอกไม้ประดับ ปทุมมาที่มีศักยภาพในการพัฒนาสู่ตลาดโลก ได้แก่ ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ (สุรวิษ, 2537) ในการผลิต ปทุมมาเป็นการค้าขึ้นไม่สามารถปลูกต่อเนื่องกันได้ เนื่องจากปทุมมามีการพักตัวในช่วงวันสั้น ซึ่งเป็นช่วง ฤดูหนาวและเป็นช่วงที่ตลาดต้องการดอกไม้เป็น จำนวนมาก ปัญหาที่เกิดจากการพักตัวของปทุมมา สามารถนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย แก้ไขซึ่งเทคโนโลยีนี้ได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการ เพาะเลี้ยงโสมาคิกเอ็มบริโอของพืชจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ตาของขมิ้นชัน (Gayatri *et al*, 2005) รากจากต้น ปลอดเชื้อของขมิ้นอ้อย (Mello *et al*, 2001) ยอดของขิง (Malamug *et al*, 1991) การเพาะเลี้ยงโสมาคิกเอ็มบริโอ มีบทบาทและความสำคัญต่อการขยายพันธุ์พืช จาก แนวคิดนี้จึงได้ทำการศึกษาดังนี้ถึงปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ โสมาคิกเอ็มบริโอของปทุมมาเชียงใหม่พื้งค์และปทุม มาลัดดาวาลย์เพื่อให้ได้องค์ความรู้เพื่อนำไปใช้ในการ ขยายและเพิ่มปริมาณด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงโ สมาคิกเอ็มบริโอต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ 2,4-D ที่เหมาะสมสำหรับการชักนำปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ ลัดดาวาลย์ให้เกิดโสมาคิกเอ็มบริโอ (somatic embryo)
2. เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และมอลโตส ที่มีผลต่อการเกิดยอดในโสมาคิก เอ็มบริโอของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมา พันธุ์ลัดดาวาลย์

วิธีการวิจัย

ในการศึกษานี้ใช้ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์ และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวาลย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงช่อ ดอกอ่อน โดยนำช่อดอกอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนการ เพาะเลี้ยง โดยล้างช่อดอกอ่อนของปทุมมาพันธุ์

เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวาลย์ล้างด้วยสบู่ เหลวและล้างสบู่ออกจากช่อดอกออกภายใต้น้ำไหล แชนในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และ ฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (Clorox[®], 1.40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) sodium hypochlorite) 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และฟอกครั้งที่ 2 ด้วย สารละลายคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้าง ช่อดอกอ่อนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อ 3 ครั้ง ตัด กลีบดอกออก และเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อน บนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-เบสที่ 5.7 เติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยแสงจากหลอด ฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ช้ายเนื้อเยื่อที่เจริญ จากช่อดอกอ่อนลงอาหารเดิมทุกๆ 5 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือนเพื่อเพิ่มจำนวน

การชักนำโสมาคิกเอ็มบริโอ

นำต้นปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมา พันธุ์ลัดดาวาลย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 2 4 6 8 10 12 และ 14 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-เบสของอาหารสูตร MS อยู่ที่ 5.7 และเติม Phytigel[®] 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเกิด โสมาคิกเอ็มบริโอ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น โดยทำการบันทึก จำนวนชิ้นพืชที่เกิดโสมาคิกเอ็มบริโอหลังการเพาะเลี้ยง ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวาลย์ ตลอดระยะเวลาการทดลอง

การชักนำยอดจากโสมาคิกเอ็มบริโอ

นำโสมาคิกเอ็มบริโอที่ได้จากการชักนำ มา เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เปรียบเทียบน้ำตาลสาม

ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส และมอลโตส ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเป็นเบสของอาหารสูตร MS อยู่ที่ 5.7 และเติม Phytagel® 2.5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์วางแผนการทดลองแบบกลุ่มสมบูรณ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 10 กลุ่มจากนั้นบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้น

ผลการวิจัย

จากการทดลองชักนำไซมาติกเอ็มบริโอในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และพันธุ์ลัดดาวัลย์โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่างกัน 8 ระดับ (0-14 มก./ล.) ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอในปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งการชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดไซมาติกเอ็มบริโออย่างชัดเจน (ตารางที่ 1 และ 2) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์บนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 8 ถึง 14 มก./ล. มีผลชักนำไปปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์เกิดไซมาติกเอ็มบริโอและเมื่อนำไซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 14 มก./ล. ซึ่งเป็นสูตรที่เกิดไซมาติกเอ็มบริโอที่ดีที่สุดคือ 90 เปอร์เซ็นต์ มาทำการทดลองชักนำยอด

จากการทดลองชักนำยอดจากไซมาติกเอ็มบริโอในปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เปรียบเทียบกับน้ำตาลสาม ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส และมอลโตส ความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร พบว่าชนิดของน้ำตาลมีผลต่อการชักนำการเกิดยอดในปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งการชักนำการเกิดยอดของไซมาติกเอ็มบริโอบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลต่างชนิดกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดอย่างชัดเจนดังตารางที่ 3 และ 4

การชักนำยอดจากไซมาติกเอ็มบริโอของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์บนอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตส 0.25 กรัมต่อลิตร มีผลให้ไซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาเป็นยอดได้ดีที่สุดคือ 50.00 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่มีผลต่อการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์

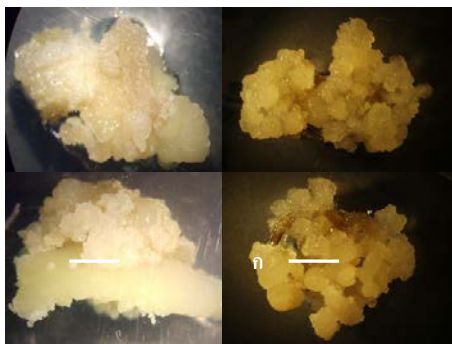
2,4-D (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดไซมาติกเอ็มบริโอ (%)
0	0.00 ^c
2	0.00 ^c
4	0.00 ^c
6	0.00 ^c
8	36.67 ^d
10	46.67 ^c
12	80.00 ^b
14	90.00 ^a
sig	**

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.01$

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่มีผลต่อการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอในปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์

2,4-D (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์การเกิดไซมาติกเอ็มบริโอ(%)
0	0.00 ^d
2	0.00 ^d
4	0.00 ^d
6	0.00 ^d
8	60.00 ^c
10	66.67 ^{bc}
12	76.67 ^b
14	90.00 ^a
sig	**

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.01$



ภาพที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่มีผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก)ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 12 มก./ล. (ข)ปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 12 มก./ล. (ค)ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 14 มก./ล.(ง)ปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์บนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 14 มก./ล. (bar = 1cm)

ตารางที่ 3 ผลของอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และมอลโตส ที่มีต่อการชักนำยอดในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์

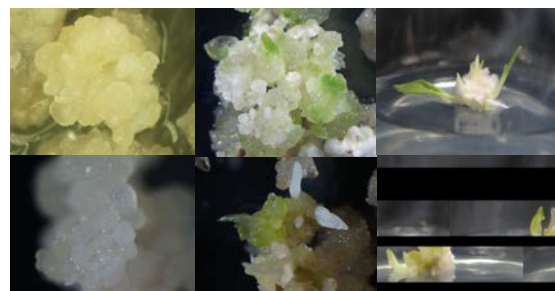
อาหาร MS	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (%)
อาหาร MS ไม่เติมน้ำตาล	0.00 ^c
อาหาร MS เติมน้ำตาลกลูโคส	23.33 ^b
อาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส	23.33 ^b
อาหาร MS เติมน้ำตาลมอลโตส	50.00 ^a
sig	**

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.01$

ตารางที่ 4 ผลของอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล กลูโคส ซูโครส และ มอลโตส ที่มีต่อการชักนำยอดในปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์

อาหาร MS	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (%)
อาหาร MS ไม่เติมน้ำตาล	0.00 ^c
อาหาร MS เติมน้ำตาลกลูโคส	13.33 ^c
อาหาร MS เติมน้ำตาลซูโครส	30.00 ^b
อาหาร MS เติมน้ำตาลมอลโตส	46.67 ^a
sig	**

** มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p \leq 0.01$



ภาพที่ 2 ผลของอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล กลูโคส ซูโครส และ มอลโตส ที่มีต่อการชักนำยอดในปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์ (ก) โซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (ข)การเกิดยอดของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (ค) ต้นปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์ที่ได้จากอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (ง) โซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมของปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (จ)การเกิดยอดของปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (ฉ) ต้นปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์ที่ได้จากอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตส (bar = 1 cm)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการทดลองชักนำโสมาคิกเอ็มบริโอจากเนื้อเยื่อปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในที่มีด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าโสมาคิกเอ็มบริโอของปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์สามารถเกิดได้คืบบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 8 10 12 และ 14 มก./ล. ซึ่ง 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินที่มีฤทธิ์ส่งเสริมให้ปทุมมาทั้งสองสายพันธุ์เกิดโสมาคิกเอ็มบริโอได้เมื่อพิจารณาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 14 มก./ล. ส่งเสริมต่อการเกิดโสมาคิกเอ็มบริโอมากที่สุดคือ 90 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทดลองของ Yaping และคณะพบว่าสามารถชักนำ *Curcuma attenuate* ให้เกิดแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2.94 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin 0.49 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน ในที่มีด และย้ายไปเพาะเลี้ยงในที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งส่งเสริมต่อการเกิดแคลลัสได้ 33.3 เปอร์เซ็นต์

การทดลองชักนำยอดจากโสมาคิกเอ็มบริโอของปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่พื้งค์และปทุมมาพันธุ์ลัดดาวัลย์ที่ชักนำได้จากอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 14 มก./ล. พบว่าเมื่อนำโสมาคิกเอ็มบริโอมาชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลมอลโตสจะสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ 50.00 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี ที่อนุญาตให้ใช้เป็นสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สุรวิษ วรรณไกรโรจน์. 2539. ปทุมมาและกระเจียว. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด(มหาชน).

อรารณ วิชัยลักษณ์. 2548. ปทุมมา. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Gayatri, M.C., V. Roopa darshini and R.

Kavyashree. 2005. Selection of turmeric callus for tolerant to culture filtrate of *Pythium graminicolum* and regeneration of plants. Plant Cell, Tissue and organ culture 83: 33 – 40

Malamug, J.J.F., H. Inden and T. Asahira. 1991.

Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. Scientia Horticulturae 48: 89-97.

Mello, M. O., M. Melo and B. Appezzato-da-Gloria.

2001. Histological analysis of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zedoaris* Roscoe. Brazilian archives of Biology and Technology 44: 197-203

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium

for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-479.